

유방암에서 액와 림프절 미세전이의 진단을 위한 역전사 중합효소반응의 의의: MUC1, Cytokeratin 19의 결과 비교

서울대학교 의과대학 외과학교실, 울산대학교 의과대학 병리학교실¹

이령아 · 강한성 · 강희준 · 김태선 · 김성숙¹ · 노동영 · 최국진

= Abstract =

Detection of Axillary Lymph Node Micrometastasis using RT-PCR: Comparison the results of MUC1, Cytokeratin 19

Ryung-Ah Lee, M.D., Han-Sung Kang, M.D., Hee-Joon Kang, M.D.,
Tae-Seon Kim, M.D., Seong-Suk Kim, M.D.¹,
Dong-Young Noh, M.D. and Kuk Jin Choe, M.D.

*Department of General Surgery, College of Medicine, Seoul National University
and Department of Pathology¹, College of Medicine, Ulsan University*

One of the most important prognostic factors in breast cancer is presence of axillary lymph node invasion. It is reported that 20-30% of node negative patients with conventional staining has a risk of relapse within five years after primary treatment. The status of lymph node can be determined by serial sectioning or immunohistochemical staining, the former was accurate but time consuming, troublesome method and the latter was unsatisfactory in accuracy and objectivity. RT-PCR is sensitive and accurate molecular method and has been used in detecting micrometastasis of lymph node, bone marrow and blood of the cancer patients. We conducted RT-PCR amplification of MUC1, cytokeratin (CK) 19 using total RNA samples of lymph nodes of 40 breast cancer patients and conducted immunohistochemical staining for cytokeratin. The results of histological examination and immunohistochemical staining of cytokeratin were compared with RT-PCR results for the detection of lymph node micrometastasis. Nineteen patients (47.5%) were lymph node positive and twenty one patients (52.5%) were lymph node negative. MUC1 and CK19 were expressed in all lymph node positive patients. Among the node negative patients, 4 cases and 5 cases were expressed MUC1 and CK19 with RT-PCR. But immunohistochemical staining method was ineffective in detecting micrometastasis because lymph nodes of negative node group were not stained for cytokeratin. This study could not rule out the false positivity of RT-PCR, so it should be conducted against variable tumor marker to overcome this fatal defect. We recommend that RT-PCR will be applied in sentinel lymph node for accurate prediction of whole lymph node status and that the patients revealed positive result in RT-PCR should be observed more closely than the other. (*Journal of Korean Breast Cancer Society* 1999;2:128~137)

Key Words: Breast cancer, Axillary lymph node, Micrometastasis, MUC1, Cytokeratin19

서 론

액와부 림프절의 전이 유무는 유방암 환자의 예후를 예측할 수 있는 가장 중요한 지표이다¹⁾. 환자의 병기는 종양의 크기와 림프절 침범 유무로 결정되고 병기에 따라 환자의 생존율이 결정되므로 림프절의 침범 유무를 결정하는 것은 매우 중요한 일이다. 또한 림프절 침윤이 있는 환자의 생존율이 침윤이 없는 환자에 비해 15% 정도 낮은 것으로 보고되고 있으므로 림프절 침윤이 있는 환자에서는 일차적인 수술 이후에 보다 적극적인 보조 요법을 실시하게 된다²⁾. 최근에는 림프절 전이가 없는 환자에서 림프절 광청술을 실시하지 않아도 생존율에 영향이 없다는 주장^{3,4)}도 조심스럽게 제기되고 있으므로 림프절의 전이유무를 파악하는 것은 치료방침을 결정하는데 있어 매우 중요한 일이다. 그러나 림프절 침윤이 없었던 환자의 20-30%가 5년 이내에 재발한다고 보고되어 있으며 재발하는 경우 일차 종양보다 진행성 유방암으로 발견될 가능성이 높다⁵⁾. 이 부분에 대해서는 아직 뚜렷한 이유가 확인되지 않았으나, 일반적 병리 검사에서 림프절의 미세 전이를 발견하지 못한 것이 중요한 원인 중의 하나가 아닐까 추측하고 있다. 따라서 일반적인 조직병리 소견에서 림프절 침윤이 없는 환자에서 미세전이를 확인할 수 있는 새로운 방법을 찾고자 여러가지 방법들을 시도하고 있다. 이 중 대표적인 것이 연속 미세 절단술(serial sectioning)^{6,7)}, 면역 조직 화학 염색^{8,9)}과 역전사 연쇄중합효소반응(Reverse transcriptase-polymerase chain reaction, 이하 RT-PCR) 등¹⁰⁾이다.

RT-PCR 방법은 Noguchi 등¹¹⁾과 Schoenfield 등¹²⁾이 유방암 환자의 림프절에서 MUC1과 Cytokeratin 19(이하 CK¹⁹⁾)에 실시하여 미세전이를 확인하는데 효과적이라고 보고한 이후 MUC1¹³⁾과 cytokeratin 8, 18,¹⁴⁾ 19,¹⁵⁾ 20,¹⁶⁾ CEA,¹⁷⁾ CD44,¹⁸⁾ GA733.2,¹⁴⁾ Thyroid Trancscription Factor-1¹⁹⁾, mammaglobin 등²⁰⁾ 여러 가지 종양 표지자에 대해 RT-PCR을 실시하여 미세전이를 진단하고자 시도하고 있다. RT-PCR은 다른 방법에 비해 민감도가 높으나 위양성의 가능성을 배제하기 어렵고 이 방법으로 확인된 소량의 유전자

표현이 어떠한 임상적인 의의를 갖는지 아직도 확인되지 못한 상태이다.

본 저자들은 유방암의 미세전이의 확인을 위해 가장 광범위하게 사용되고 있는 MUC1과 CK19에 대한 RT-PCR을 실시하고 기존의 일반적 병리 결과와 cytokeratin에 대한 면역조직화학 염색 결과를 비교하여 각각의 효율성과 앞으로의 사용 지침에 대해 제시해 보고자 본 연구를 실시하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

서울대학교 의과대학 외과학교실에서 유방암으로 수술받은 환자 40명의 림프절 조직을 연구대상으로 하였다. 이들은 수술 전에 항암치료를 방사선 치료 등을 받은 적이 없었던 환자들로서, 유방 절제수술을 시행받고 동결조직의 확보가 가능하였던 환자를 대상으로 한 것이다. 수술 당시 중간 크기의 림프절을 선택하여 장축을 기준으로 반분한 후 한 쪽은 일반적 병리검사에 이용하고 다른 한쪽은 -70℃ 냉동고에 보관하였다. 이 보관 조직을 다시 두 조각으로 나누어 하나는 RT-PCR에, 다른 하나는 포르말린에 고정하여 4 μ m 박절하고 H&E 염색과 cytokeratin에 대한 면역 조직화학 염색에 사용하였다. 환자들의 의무기록지를 조사하여 연령, 병기, 호르몬 수용체 유무, 병리 소견 등을 확인하고 비교하였다.

통계 분석은 Chi-square test를 사용하였고 p값이 0.05 이하일 때 의의가 있는 것으로 판정하였다.

2. 실험 방법

1) 역전사 연쇄 중합효소 반응

유방암 환자의 림프절 조직 중 일부의 냉동 조직을 막자사발에 넣고 액체질소를 부으면서 잘게 조직을 분쇄한 다음 이 가루를 eppendorf tube에 모으고 TRIzol (Gibco-BRL Co.) 시약을 조직 1 g당 1 ml을 첨가하고 잘 흔들어 준후 상온에 약 5분간 방치하였다. 상층액 600 μ l를 건어 세 tube에 모은 후 chloroform 200 μ l 첨가하고 14,000 rpm, 4℃도에서 10분간 원심분리하였다. 이 중 상층액 500 μ l를 건어서 다시 세 tube로 옮기고 isopropyl alcohol을 동량 넣

고 얼음에 15분 정도 방치한 후 다시 14,000 rpm에서 10분 정도 원심분리하여 pellet을 확인하고 상층액을 제거하였다. 75% ethanol을 300 μ l 넣고 3분간 원심분리하여 씻어준 후 ethanol을 제거하였다. 20-30 μ l의 DEPC water를 넣고 분리된 RNA를 잘 용해시킨 후 분광광도계를 사용하여 RNA를 정량하고 -20°C 냉동고에 보관하였다.

정량한 RNA를 random primer를 사용하여 역전사하였다. RNA 정량결과에 따라 3 μ g을 정량하여 template로 사용하고 random primer 2 μ l, dNTP mixture 1 μ l, 5x PCR 완충액 3 μ l, 0.1 M DTT 1 μ l, RNase inhibitor 1.0 μ l과 MMLV-reverse transcriptase 0.1 μ l을 넣고 잘 섞은 후 37°C에서 60분, 99°C에서 5분동안 반응시킨 후 4°C에서 반응을 정지시켜 cDNA를 얻었다.

이렇게 얻어진 cDNA는 phenol:chloroform: isoamyl alcohol 25:24:1 용액을 동량 넣어 정제하고 이것을 15,000 rpm, 4°C에서 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 다시 eppendorf tube에 넣고 동량의 99.9% ethanol을 넣어서 -20°C에서 10분간 침전시켰다. 다시 15,000 rpm, 4°C에서 10분 동안 원심 분리하여 상층액은 버리고 70% ethanol로 잘 씻어준 다음, 15,000 rpm, 4°C에서 10분 동안 원심 분리하여 얻은 pellet을 상온에서 말린 후에 3차 증류수 20 μ l을 넣어 녹인 후 4°C에 보관하였다.

Noguchi 등²¹⁾에 의해 보고된 MUC1과 CK19에 대한 시발체(primer) 서열을 확인하여 제작한 후 RT-PCR을 실시하였다. cDNA는 3 μ l을 사용하였고 10x PCR 완충액 2.5 μ l, 2.5 mM dNTP 혼합물 2 μ l를 사용하고, 시발체는 전진형과 역행형을 각각 10 pmol씩 사용하였다. 여기에 Taq polymerase (Takara Shuzo Co.)를 0.1 μ l (5 units/ μ l)씩 첨가하였고 thermal cycler (MJ Research Co.)를 사용하여 94°C에서 1분, 53°C에서 1분, 72°C에서 1분간 40회 증폭하였다. 비교군으로 β -actin에 대한 시발체를 제작하여 연쇄 증합효소반응을 수행하였다. 이렇게 시행된 연쇄 증합효소반응 결과 얻어진 산물은 6x loading dye를 첨가하여 1.7% agarose gel에서 50 V로 전기영동한 후 Ethidium Bromide로 염색하였다. 이것을 자외선 투시기 하에서 band를 확인하였다.

2) 면역조직화학 염색

면역조직화학 염색은 기존에 알려진 통상의 방법²²⁾으로 cytokeratin에 대한 단일 클론 항체(Dako Co.)를 사용하여 실시하였으며 연이은 절편에서 다시 H & E 염색을 실시하여 종양 조직을 확인하였다. 림프절 조직을 포르말린에 고정하였다가 파라핀에 포매하고 이를 4 μ m 두께로 박절하여 유리슬라이드 위에 놓은 뒤 xylene으로 탈파라핀화한 다음 0.3% H₂O₂ 용액으로 재가수화하였다. 10⁻³ M sodium citrate buffer에 담근 뒤 pressure cooker에 1시간동안 두었다가 식히고 PBS로 세척하였다. 1:2000으로 희석한 일차항체를 붙이고 4°C에서 밤새도록 반응시킨 후 세척하였다. biotylated anti-mouse immunoglobulin과 streptavidin을 상온에서 30분간 반응시킨 후 마지막으로 발색을 위해 AEC (Alkaline phosphatase Enzyme Conjugates)로 염색하고 헤마톡실린으로 대조염색을 실시하였다. 진한 적색으로 발색된 부위가 전체의 5% 이상인 경우를 양성으로 판정하였고 그 이하의 경우를 음성으로 판정하였다.

결 과

1. 임상적 소견

환자들의 평균 연령은 46.6세였고 표준 편차는 9.6이었다. 환자들의 임상적 병리적 특성을 림프절의 냉동절편을 이용한 H&E 염색 결과에 따라 전이가 있는 군과 전이가 없는 군으로 분류하였다(Table 2). 전체 환자 40명 중 H&E 염색상 림프절 침윤이 있는 환자가 19명(47.5%), 침윤이 없는 환자가 21명(52.5%)이었다. 림프절 침윤이 있는 군 중 2예는 최종 병리 보고서에서는 림프절 전이가 없는 것으로 보고되었으나 연구 대상 림프절에서 종양 세포가 확인되어 침윤이 있는 군으로 분류하였고, 침윤이 없는 군 21예 중 4예는 다른 림프절에서는 종양 세포를 확인하였으나 연구 대상이었던 림프절에서 종양 세포를 확인하지 못하여 침윤이 없는 군으로 분류하여 비교하였다(Fig. 1A).

병리형태에 따라 분류해 보면, 림프절 침윤이 없는 군에서는 관상피내암이 3예, 침윤성 관상피내암이

Table 1. Primer Sequences Used in RT-PCR

Tumor Marker	Product Size (bp)	Sequences (5'-3')
MUC 1	288	CGTCGTGGACATTGATGGTACC GGTACCTAATCTCACCTCCTCCAA
Cytokeratin 19	460	AGGTGGATTCCGCTCCGGGCA ATCTTCCTGTCCCTCGAGCA
β -actin	154	CACTGTGTTGGCGTACAGGT TCATCACCATTGGCAATGAG

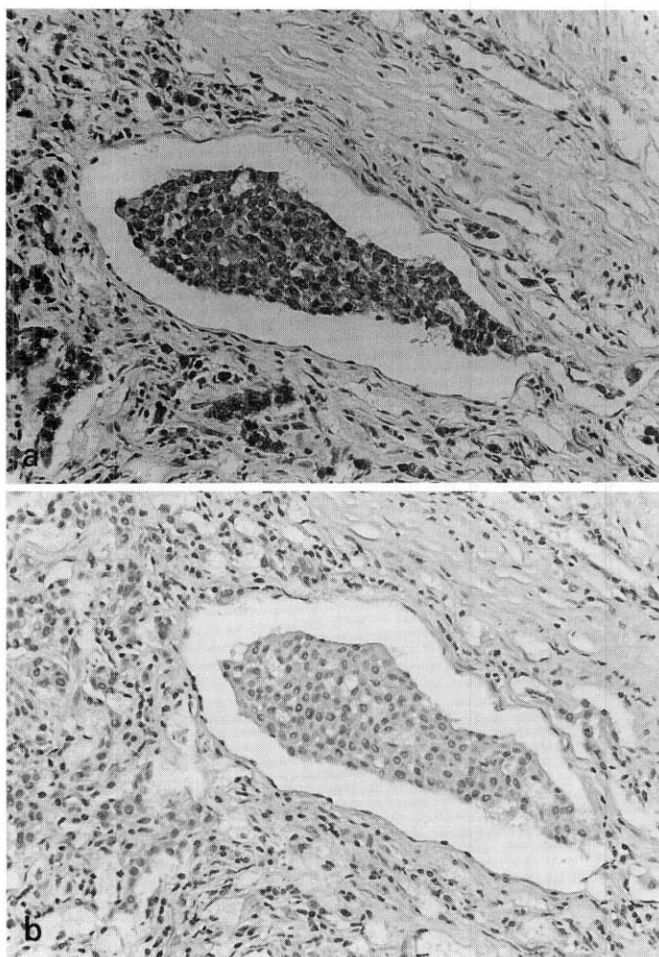


Fig. 1. Pathologic Findings of Patient who had lymph node metastasis (A) Photograph of H&E stain revealed the cancer focus in the center ($\times 200$). (B) Immunohistochemical staining of sequential section for cytokeratin was done for the same case to compare the detectability. Red colored area was read as positive result ($\times 200$).

Table 2. Clinicopathologic Characteristics of 40 Patients

	Lymph node positive (n=19)	Lymph node negative (n=21)
Age distribution		
<30	2	1
31-40	5	5
41-50	8	5
51-60	1	7
61<		1
Tumor direction		
Right	8	10
Left	11	11
Pathology		
DCIS	0	3
IDC	18	17
Medullary cancer	1	0
Apocrine cancer	0	1
Stage		
0	0	3
I	0	8
IIA	5	5
IIB	8	4
IIIA	5	1
IIIB	1	0
Estrogen receptor		
Positive	5	6
Negative	11	13
Progesterone receptor		
Positive	3	3
Negative	13	16
Nuclear Grade		
1	11	4
2	7	11
3	0	0
Histologic grade		
1	2	1
2	3	7
3	12	5

17예였고 apocrine cancer가 1예 있었으며 림프절 침윤이 있는 군에서는 침윤성 관상피암이 18예였고 수질암이 1예 있었다. 병기에 따른 분류하면 림프절 침윤이 없었던 군은 0기가 3예, 1기가 8예, II기가 9예, III기가 1예 있었고, 침윤이 있었던 군은 0, 1기는 없었고 II기가 13예, III기가 6예 있었다. 호르몬

수용체 상태는 양 군이 유사한 분포를 보였다. 조직학적 분화도나 연령별 분포 역시 림프절의 전이 유무에 따른 통계적 차이점은 없었다.

2. RT-PCR 결과

양성 대조군으로 유방암 세포주인 MCF 7과 SK-

BR-3 세포주를 사용하였고 정상 유방과 유방암 조직에서 RNA를 추출하여 림프절의 결과와 비교하였다(Fig. 2). 두 가지 유방암 세포주와 유방암 조직에서는 MUC1과 CK19 모두 양성 반응을 보였는데 CK19의 경우에는 460 bp, MUC1인 경우 288bp의 위치에서 band를 확인할 수 있었으며 정상 유방조직

에서는 band가 없었다. 그러나 정상 대장조직과 정상 위점막의 경우 MUC1과 CK19 모두 검출되었다.

유방암 세포주에서의 MUC1과 CK19의 발현을 확인하고 난 후 수집한 림프절에서 RT-PCR을 시행하였는데 MUC1의 경우 23예(57.5%)에서 양성 반응을 보였고 CK19의 경우에는 24예(60.0%)에서 양성 반응을 나타냈다(Table 3). 림프절 침윤 여부에 따라 분류하면, 림프절 침윤이 있었던 경우 MUC1과 CK19 모두 band가 확인되었으며, 림프절 침윤이 없었던 경우에는 MUC1이 4예(19.0%), CK19는 5예(23.8%)에서 band가 확인되었고 이 중 양성률이 모두 양성을 나타냈던 경우는 4예였다. 위의 결과를 종합하면 MUC1과 CK19의 일치율은 97.5%였다.

cytokeratin에 대한 면역 조직 화학 염색 결과 18예(45%)에서 cytokeratin에 대한 양성 결과를 보였는데(Fig. 1B, Table 4) 18예 모두 전이가 있었던 림프절이었다. 나머지 1예는 음성이었으나 RT-PCR에서

Table 3. Results of RT-PCR

	Lymph node status	
	Positive	Negative
MUC1		
(-)	0	17
(+)	19	4
CK19		
(-)	0	16
(+)	19	5

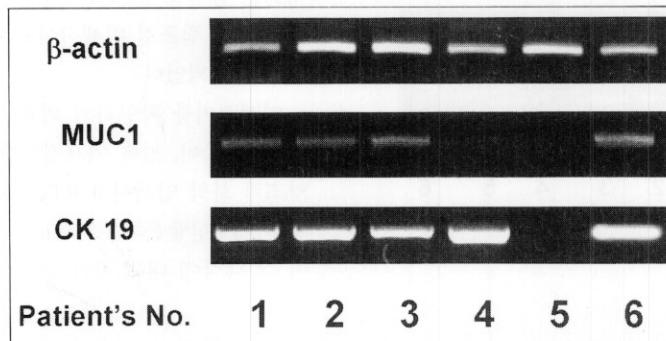


Fig. 2. Detection of MUC1, Cytokeratin 19 mRNA by RT-PCR. Breast cancer cell lines- MCF-7 and SK-BR-3 and breast cancer tissue expressed both mRNA but normal breast tissue did not expressed band. Contrary to breast tissues, normal colon and stomach expressed both mRNA. Lane1, MCF-7; lane 2, SK-Br-3; lane 3, breast cancer tissue; lane4, normal breast tissue; lane 5, normal colon tissue; lane6, normal stomach tissue.

Table 4. Results of Immunohistochemistry for Cytokeratin

Immunohistochemical stain results	Lymph node status	
	Positive (%)	Negative (%)
Negative	1 (5.3)	21 (100)
Positive	18 (94.7)	0 (0)

는 확실한 양성 반응을 확인할 수 있었다. 또한 전이가 없었던 림프절은 모두 음성이었다. 따라서 MUC1의 RT-PCR 결과와의 일치율은 87.5%였고 CK19의 RT-PCR결과와의 일치율은 85%였으며 최종 병리결과와의 일치율도 85%였다.

림프절 침윤이 없는 군에서 MUC1과 CK19의 양성 반응을 보인 림프절의 환자 5예를 정리하였으나 특이한 임상 양상은 확인할 수 없었다(Table 5).

고 찰

유방암의 치료 방법은 지난 20년 사이에 크게 변화하여 과거에는 근치적 절제술이 원칙이었으나 최근에는 수술 범위를 최소화하려는 시도들이 이루어지고 있다. 이러한 변화는 근치적 절제술을 시행받

은 환자의 생존율이 그런 수술을 받지 않은 환자と比較할 때 차이가 없다는 과학적 근거를 바탕으로 하고 있으며, 유방 보존 술식 등을 시행하는 경우 유방 절제술 후 많은 환자들이 겪게 되는 심리적 위축감을 최소화하고 수술 후의 합병증도 감소시킬 수 있는 장점이 부각되고 있기 때문에 점차 증가하는 추세이다. 이러한 변화에 힘입어 최근에는 과거에 표준 치료로 여겨지던 액와 림프절 광청술도 환자에 따라 선택적으로 시행하고자 하는 시도들이 이루어지고 있으며 주로 수술전에 진찰 소견이나 방사선 검사상 림프절 침윤이 없는 환자를 대상으로 시도되고 있다. 그러나 수술전 검사 소견이 반드시 침윤 유무를 정확히 예측하는 것은 아니며 침윤이 없을 것으로 생각되는 환자에서 수술 당시 림프절의 증대와 침윤을 확인하는 경우도 드물지 않다. 또 앞서 말한 바와 같이 최종 병리 보고서에 림프절 침윤이 없었던 환자의 20-30%가 5년 이내에 재발하는 것으로 보고되고 있으므로 림프절의 침윤 유무를 결정하는 새로운 방법을 모색하고자 하는 시도들이 이루어지고 있으며 림프절 미세전이의 유무를 확인하는 것이 중요하게 되었다.

미세전이를 확인하기 위한 방법으로는 앞서 기술한 바와 같이, 연속 미세절단술(serial sectioning), 면역조직 화학 염색이나 RT-PCR 등이 있다. 이 중 연속 미세절단술은 0.2-2 mm 두께로 미세절편을 만들어 그 각각에 대해 병리 검사를 실시하는 것으로 민

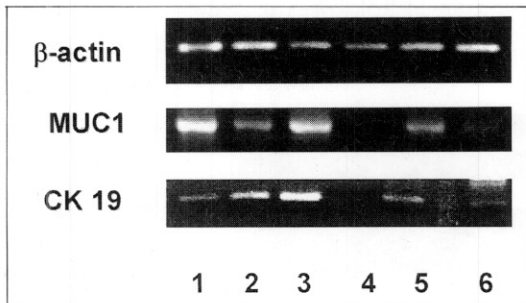


Fig. 3. Results of RT-PCR in lymph nodes of 40 breast cancer patients.

Table 5. Clinicopathologic Feature of Lymph Node Negative Patients Expressed Positive RT-PCR Results

Patient No.	Age	MUC1	CK19	ER	PR	T	N	Stage	NG	HG	Pathology
25	47	+	+	-	-	1	0	I	2	2	IDC
29	44	-	+	-	-	2	0	IIA	1	1	IDC
32	57	+	+	-	-	3	0	IIB	1	1	IDC
36	32	+	+	+	+	1	0	0			DCIS
37	35	+	+	-	-	2	0	IIB	1	3	IDC

ER: estrogen receptor.

PR: progesterone receptor.

NG: nuclear grade.

HG: histologic grade.

IDC: infiltrating ductal carcinoma.

DCIS: ductal carcinoma in situ.

감도가 매우 높으나 시간과 노동력이 많이 필요해서 현실적으로는 사용하는데 제한이 있다. 면역 조직화학 염색 방법은 비교적 손쉽고 경제적이거나 판독방법이 객관적이지 않고 재연성이 타 방법에 비해 낮다는 단점이 계속 지적되고 있다. 이에 비해 RT-PCR은 민감도가 높으며 경제적이고 객관성이 유지된다는 점에서 기존의 방법보다 이상적인 방법으로 생각되어 많은 연구가 이루어졌으나 위양성의 가능성을 제외하지 못하고 있다.

저자들은 MUC1과 CK19에 대한 RT-PCR을 시행하여 H&E 염색결과, 면역조직화학 염색결과와 비교해 보고 RT-PCR이 림프절의 미세전이를 확인하는데 유효한지 확인해 보고자 본 연구를 실시하였다. 결과에서도 언급한 바와 같이 림프절 전이가 있었던 군에서는 MUC1과 CK19가 19예 모두 발현되어 민감도가 100%이었으며, H&E 염색결과 림프절 전이가 없었던 군 중 5예에서도 MUC1과 CK19의 발현을 확인하였다(Table 5). 실험의 특이도를 확인하기 위하여 정상 림프절 6예에서 RT-PCR을 시행하였으나 MUC1과 CK19의 경우 모두 음성이었으며 b-actin에 대한 RT-PCR을 함께 시행하여 이 결과가 RNA degradation 때문이 아니라는 것을 확인하였다. 이 5예의 환자들의 임상적 소견을 분석해 보면 관상피내암이 1예, 침윤성 관상피암이 4예였고, 호르몬 수용체 음성인 예가 4예였으며 최종 병리판독 보고상 병기가 0기인 예가 1예, I기가 1예, IIA기가 1예, IIB기가 2예였다. 그러나 cytokeratin에 대한 면역조직화학 염색 결과 5예 모두 음성 소견을 보였고 추가적인 H&E 염색에서도 종양세포를 확인할 수 없었으나 이 중 1예에서는 최종병리판독 결과 다른 림프절에서 전이가 확인되었다. 이 결과에 따르면 RT-PCR이 면역조직화학 염색 방법보다 더 민감한 방법인 것으로 생각되나 RT-PCR 양성인 경우 병리검사상 미세전이를 확인하는 것은 실패하였다. 그러나 병리적 검사를 위한 림프절의 절편과 RT-PCR에 이용된 림프절의 조각이 다르므로 병리검사에서 종양세포를 확인하지 못하였어도 미세전이의 가능성을 완전히 배제할 수는 없다. 특히 RT-PCR은 106개의 세포 중 1개에서 유전자가 발현되어도 그것을 증폭하여 확인할 수 있을 정도로 민감도가 높은 방법

으로 RT-PCR의 결과 양성으로 판독된 것을 모두 위양성이라고 판독해서는 안될 것이다. 이러한 위양성의 가능성은 기존의 종양 표지자에 대한 RT-PCR을 미세전이를 확인하는 방법으로 사용하는데 있어서 가장 큰 약점으로, 새로운 종양 표지자가 확인되거나 유방암에 특이한 유전자가 발견될 때까지는 특이도를 향상시키기 위해 기존에 알려진 여러 종류의 종양 표지자에 대한 RT-PCR을 종합적으로 시행하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

유방암의 종양 조직에 특이한 것으로 생각되어지던 MUC1이나 cytokeratin 19 등이 최근 정상 혈액이나 림프절에서도 발견되어 종양표지자로서의 의의가 없다는 보고들이 있다. 과거 Noguchi 등¹¹⁾은 MUC1에 대한 RT-PCR을 림프절 침윤이 없었던 유방암 환자의 림프절에서 실시하여 15%에서 band를 확인하였고 이는 미세전이를 의미하는 것으로 보고하였다. 그러나 Dent 등²³⁾은 MUC1의 민감도, 특이도를 확인하기 위하여 정상 자원자 4명의 혈액과 골수, 림프절에서 MUC1에 대한 RT-PCR과 western blotting을 시행하여 보고하였는데 4예 모두 정상 림프절에서 양성 반응을 보여 기존에 조혈세포에서는 발현되지 않는다고 알려져 있던 MUC1 유전자가 정상에서도 확인된다고 보고하고 있다. 이 저자들은 Noguchi 등의 보고가 primer의 민감도나 실험 당시의 template DNA에 의한 오염에 의한 위양성 결과의 가능성을 있다고 보고 MUC1이 발현된 것을 미세전이의 척도로 이용할 수 없다고 주장하고 있다. 또한 Eltahir 등¹⁸⁾은 23예의 정상인의 혈액에서 RT-PCR을 시행한 결과, MUC1의 경우 21예에서 band를 형성하였고 CK19의 경우는 정상에서는 확인되지 않으나 종양 조직에서의 민감도가 낮으므로 사용에 제한이 있다고 보고하고 있다. Bostik 등¹⁴⁾은 13명의 정상인 자원자의 혈액 중 77%, 46%에서 CK19, MUC1이 확인되었다고 보고하였으며 정상 림프절 3예 모두 CK19와 MUC1에 대한 band를 형성하였다고 보고하고 있다. 이와 같은 최근의 연구보고는 과거 cytokeratin이나 MUC1 등의 유전자가 상피세포에만 존재한다는 Moll 등²⁴⁾의 보고나 Osborn 등²⁵⁾의 결과와 상반되는 주장으로 기존의 종양 표지자에 대한 RT-PCR 방법의 효율성에 의문을 제기하고 있다.

그러나 저자들은 정상 유방조직과 정상 림프절에서의 MUC1과 CK19의 발현을 확인하지 못하였고 상기 여러 저자들의 결과는 4예, 13예, 23예 등 소수의 정상인을 대상으로 하고 있으며 대상인들의 결정 방법이나 채취한 림프절의 위치 등이 불명확하므로 결론을 내리기 위해서는 더 많은 연구가 필요할 것이다.

RT-PCR을 실시하게 되는 가장 중요한 이유는 림프절의 전이 유무를 정확하게 예측하는 것이다²⁶⁾. 이 목표를 달성하기 위해서는 적절한 림프절의 수집, 상피세포의 오염 방지, primer의 효율성이나 실험자의 숙련도나 실험 자재의 양과 질 등 여러가지 요인이 작용할 것으로 생각된다. 본 연구 결과에서도 알 수 있듯이 RT-PCR을 위한 림프절을 수집하는 단계에서 어떤 림프절을 검사의 대상으로 결정하는가 하는 것은 정확한 결과를 얻는데 가장 중요한 요인이다. 저자들은 평균적 크기의 림프절을 선택하여 시료로 사용하였으나 이 방법은 편견이 내재할 수 있고 선택된 림프절이 전체 림프절의 상태를 모두 반영한다고 할 수는 없으므로, 현재 수술의 범위를 결정하기 위해 실시하고 있는 감시 림프절(sentinel node)²⁷⁾에서 RT-PCR을 실시하는 것이 림프절의 전체 상태를 예측하는데 효과적일 것으로 생각된다.

결 론

저자들은 유방암 환자 40명의 림프절을 대상으로 MUC1과 CK19에 대한 RT-PCR과 cytokeratin에 대한 면역조직화학 염색을 실시하여 비교하였다. RT-PCR 결과 림프절 전이가 없는 환자의 4예에서 MUC1이, 5예에서 CK19가 발현되었고 전이가 있는 군에서는 모두 발현되었다. 면역조직화학 염색 소견상 전이가 있는 군의 94.7%에서 양성이었고 전이가 없는 군에서는 모두 음성이어서 미세전이의 확인에는 적합하지 않은 것으로 생각된다. RT-PCR을 이용하여 미세전이를 진단하기 위해서는 위양성의 문제를 해결하는 것이 급선무이므로 신빙성 있는 결과를 얻기 위해서는 여러 종양 표지자에 대한 RT-PCR을 동반 시행하는 것이 추천되며 감시 림프절을 검사의 대상으로 하여 전체 림프절의 상태를 예측할 수 있도록 하는 것이 바람직하겠다. 또 양성 결과를 보인

환자에서는 위양성의 가능성을 배제할 수는 없으나 다른 환자보다 더 자주 관찰하고 추적조사하는 것이 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Hutter RVP: The role of the pathologist in breast cancer management. *Cancer*, 66:1363, 1990
- 2) Fisher ER, Redmond C, Fisher B: Prognostic factors in NSABP studies with node negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 11:151, 1992
- 3) Kinne DW: Axillary clearance in operable breast cancer: still a necessity? *Recent Results Cancer Res*, 152:161, 1998
- 4) Parmigiani G, Berry DA, Winer EP, Tebaldi C, et al: Is axillary lymph node dissection indicated for early-stage breast cancer? A decision analysis. *J Clin Oncol* 17(5):1465, 1999
- 5) Insa A, Lluch A, Prosper F, Marugan I, et al: Prognostic factors predicting survival from first recurrence in patients with metastatic breast cancer: analysis of 439 patients. *Breast Cancer Res Treat* 56(1):67, 1999
- 6) Zhang PJ, Russell M, Reisner MD, Nangia R, et al: Effectiveness of multiple level sectioning in detecting axillary nodal micrometastasis in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 122:687, 1998
- 7) Dawlatshahi K, Fan M, Bloom KJ, Sapitz DJ, et al: Occult metastases in the sentinel lymph nodes of patients with early stage breast carcinoma. *Cancer* 86(6):990, 1999
- 8) Tsuchiya A, Sugano K, Kimujima I, Abe R: Immunohistochemical evaluation of lymph node micrometastases from breast cancer. *Acta Oncologica* 35(4):425, 1996
- 9) Clare SE, Sener SF, Wilkens W, Goldschmidt R, et al: Prognostic significance of occult lymph node metastases in node-negative breast cancer. *Ann J Surg Oncol* 4(6):447, 1997
- 10) Raj GV, Moreno JG, Gomella LG: Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors. *Cancer* 82:1419, 1998

- 11) Noguchi S, Aihara T, Nakamori S, Motomura K, et al: The detection of breast carcinoma micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer*, 74(5):1595, 1994
- 12) Scoenfeld A, Luqmani Y, Smith D, O'Reilly S, et al: Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by using polymerase chain reaction 54:2986, 1994
- 13) Noguchi S, Aihara T, Motomura K, Inaji H, et al: Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Comparison between MUC1 mRNA and keratin 19 mRNA amplification. *Am J Pathol* 148(2):649, 1996
- 14) Bostick PJ, Chatterjee S, Chi DD, Hunch KT, et al: Limitations of specific reverse-transcriptase polymerase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients. *J Clin Oncol*, 16(8):2632, 1998
- 15) Schoenfeld A, Kruger KH, Gomm J, Sinnett HD, et al: The detection of micrometastases in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer using immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19. *Er J Cancer* 33(6):854, 1997
- 16) Burchill SA, Bradbury MF, Pittman K, Southgate J, et al: Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 71:278, 1995
- 17) Neumaier M, Gerhard M, Wagener C: Diagnosis of micrometastases by the amplification of tissue-specific genes. *Gene* 159:43, 1995
- 18) Eltahir EM, Mallinson DS, Birnie GD, Hagen C, et al: Putative markers for the detection of breast carcinoma cells in blood. *Br J Cancer* 77(8):1203, 1998
- 19) Harlamert HA, Mira J, Bejarano PA, Baughman RP, et al: Thyroid transcription factor-1 and cytokeratins 7 and 20 in pulmonary. *Acta Cytol* 42(6):1382, 1998
- 20) Leygue E, Snell L, Dotzlaw H, Hole K, et al: Mammaglobin, a potential marker of breast cancer nodal metastasis. *J Pathol* 189(1):28, 1999
- 21) Noguchi S, Aihara T, Motomura K, Inaji H, et al: Histologic characteristics of breast cancers with occult lymph node metastases detected by keratin 19 mRNA reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer* 78(15):1235, 1996
- 22) de Mascarel I, Bonichon F, Coindre JM, Trojani M: Prognostic significance of breast cancer axillary lymph node micrometastases assessed by two special techniques:reevaluation with longer followup. *Br J Cancer* 66:523, 1992
- 23) Dent GA, Civalier CJ, Brecher ME, Bentley SA: MUC1 expresseion in hematopoietic tissues. *Am J Clin Pathol* 111:741, 1999
- 24) Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, et al: The catalogue of human cytokeratin:patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cell. *Cell* 31:11, 1982
- 25) Osborn M, Weber K: Tumor diagnosis by intermediate filament typing:a novel tool for surgical pathology. *Lab Invest* 48(4):372, 1983
- 26) Allred DC, Elledge RM: Caution concerning micrometastatic breast carcinoma in sentinel lymph nodes. *Cancer* 86(6):905, 1999
- 27) Giuliano AE, Dale PS, Turner RR, Morton DL, et al: Improved axillary staging of breast cancer with sentinel lymphadenectomy. *Ann Surg* 222(3):394, 1995